



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA BUCOFACIAL**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
Máster Ciencias Odontológicas

**TERAPIA FOTODINÁMICA APLICADA COMO
COMPLEMENTO DEL TRATAMIENTO
PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO EN
PERIODONTITIS CRÓNICA: ASPECTOS
CLÍNICOS E INFLAMATORIOS.**

Diana Patricia Noguera Vargas

**Directores:
Juan Antonio García Núñez
Clara Gómez Hernández**



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, U.C.M.
INSTITUTO QUÍMICA FÍSICA ROCASOLANO, C.S.I.C.**



JUAN ANTONIO GARCÍA NÚÑEZ, Profesor Titular del Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

M^a CLARA GÓMEZ HERNÁNDEZ, Científico Titular del Departamento de Sistemas de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada del Instituto de Química Física “Rocasolano” del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid;

CERTIFICAN: que la presente Memoria titulada *“Terapia fotodinámica como complemento del tratamiento periodontal no-quirúrgico en periodontitis crónica: aspectos clínicos e inflamatorios”* llevada a cabo por **Dña. Diana Patricia Noguera Vargas** ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Creemos que la mencionada Memoria reúne las características para ser defendida ante un Tribunal para la obtención del Máster en Ciencias Odontológicas.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a cuatro de septiembre de dos mil doce.

Fdo:
Juan Antonio García Núñez

Fdo:
M^a Clara Gómez Hernández

ÍNDICE

1. Introducción	5-21
2. Hipótesis y Objetivos.....	22-24
3. Material y Métodos.....	25-35
4. Resultados.....	36-45
5. Discusión.....	46-54
6. Conclusiones.....	55-56
7. Bibliografía.....	57-67

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad periodontal

La periodontitis crónica es una enfermedad inflamatoria de los tejidos de soporte de los dientes, causada por grupos específicos de microorganismos, que provocan la destrucción progresiva del ligamento periodontal y hueso alveolar con la consiguiente formación de bolsas, recesiones o ambas (Armitage, 1999). Además, es la forma más frecuente de periodontitis.

Clínicamente, la periodontitis es diagnosticada por la pérdida de unión entre el diente y los tejidos de soporte (pérdida de inserción clínica), por la profundidad de la bolsa entre la raíz del diente y los tejidos de soporte y /o la evidencia radiográfica de pérdida ósea. El progreso de la periodontitis se presenta en periodos cíclicos de exacerbación y remisión y puede permanecer sin notarse, con síntomas mínimos en sus etapas más tempranas (Champagne y cols., 2003).

La periodontitis crónica presenta un alto componente inmunológico, que incluye una respuesta inmune de tipo celular y humoral elevada (Fuhijashi y cols., 1993). Por este motivo, la respuesta inmune e inflamatoria del huésped a la invasión bacteriana es un determinante crítico de la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad destructiva, bajo la influencia de múltiples factores (de comportamiento, ambientales y genéticos) (Champagne y cols., 2003).

La respuesta inicial a la infección bacteriana es una reacción local inflamatoria de los tejidos que activa el sistema inmune (Graves y Cochran, 2003) y viene seguida de una amplificación de esta respuesta inicial localizada. Dicha amplificación da como resultado la liberación de una serie de citocinas y otros mediadores y la propagación de la inflamación a través de los tejidos gingivales (Graves y Cochran, 2003).

Las citocinas son proteínas solubles que se unen a receptores específicos en las células diana e inician una cascada de señalización que resulta en cambios fenotípicos en la célula mediante regulación genética (Preshaw y Taylor, 2011). Son moléculas determinantes de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa ya que permiten coordinar la interacción entre varios componentes del sistema inmune (Dinarello, 2007), debido a su funcionamiento en una compleja red, que aún continúa en investigación. Por esta razón, así como en las otras enfermedades crónicas, las citocinas juegan un papel importante en el inicio, progreso y modulación de la enfermedad periodontal (Bascones y cols., 2005).

Después de un estímulo antigénico, los linfocitos TCD4⁺ naive pueden diferenciarse como células T helper CD4 (Th), que pueden ser de tipo Th1, Th2 y Th17, cada una de las cuales presentará distintos perfiles de producción de citocinas (Tesmer y cols., 2008). Las respuestas Th1 y Th2 son antagonistas entre sí y se regulan una a la otra (Vandenbroeck y Goris, 2003). La red de citocinas que media la respuesta inmune incluye citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y los receptores específicos de las citocinas.

Las células Th1 producen interleucina 2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), que inducen la inmunidad celular y la producción de citocinas pro-inflamatorias (Yamamura y cols., 1991). Además, el estímulo antigénico a células epiteliales, neutrófilos y macrófagos también induce la secreción celular de citocinas inflamatorias como interleucina 1- β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral- α (FNT- α) (Silva y cols., 2008).

Las células Th2 producen interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), las cuales han sido identificadas como anti-inflamatorias y que favorecen la inmunidad humoral mediada por las células B (Modlin y Nutman, 1993).

La expresión de las citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, FNT- α , Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) y oncostatina M (OSM), es el paso inicial para que la presencia de otros mediadores inflamatorios sea suficiente en el tejido gingival como para estimular los mecanismos de resorción ósea. Al contrario, cuando se presenta la expresión de las citocinas y otros mediadores anti-inflamatorios, tales como IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 y IL-18 así como interferón- β (IFN- β) e interferón- γ (IFN- γ), el efecto es la inhibición del proceso de resorción ósea (Lerner, 2006).

1.2. Mediadores pro-inflamatorios en el Fluído Crevicular Gingival

La composición del Fluído Crevicular Gingival (FCG) es el resultado de la interrelación entre el biofilm bacteriano (adherido a las superficies dentarias) de la bolsa periodontal y las células de los tejidos periodontales y por esta razón es considerado el principal estímulo de citocinas asociadas a periodontitis y enzimas derivadas del huésped (Cobb, 1996). La recolección del FCG es un procedimiento mínimamente invasivo y el análisis de los constituyentes específicos provee un indicador bioquímico cuantitativo para la evaluación del metabolismo celular local que refleja el estado de salud periodontal de la persona (O'Leary y cols., 1972).

La medida de los niveles de mediadores inflamatorios en el FCG ha sido utilizado para evaluar el riesgo de una localización para perder inserción clínica y hueso alveolar o riesgo para un individuo de desarrollar enfermedad periodontal (Champagne y cols., 2003). Los niveles de mediadores inflamatorios monocíticos (Prostaglandina E2 (PGE2), IL-1 y FNT- α) en el FCG pueden representar bien los marcadores ideales de la actividad de la

enfermedad a nivel de una localización (Champagne y cols., 2003). Durante los periodos de progreso o actividad de la enfermedad periodontal se evidencia un cambio en el perfil de citocinas del tipo Th2 a Th1 (Kawai y cols., 1998).

Se considera que hay una relación entre la alta producción de FNT- α y de IL-1 β y la severidad de las lesiones inflamatorias en la periodontitis (Soga y cols., 2003; Stashenko y cols., 1991; Heasman y cols., 1993) y por este motivo son numerosos los estudios previos que han evaluado sus niveles en el FCG como un factor que ayuda a determinar el estado periodontal del huésped.

1.3. IL-1 β y FNT- α

Se ha demostrado que la IL-1 y FNT- α son esenciales para la iniciación de la respuesta inflamatoria y siguiente destrucción tisular (Stashenko y cols., 1987; Ridderstad y cols., 1991), que conlleva a la pérdida de inserción y reabsorción ósea (Graves y Cochran, 2003). Ambas citocinas están asociadas típicamente con la respuesta inmune innata (Graves y Cochran, 2003), pudiendo inducir la expresión de otros mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria, tales como las prostaglandinas (Graves y Cochran, 2003). También pueden estimular la producción de enzimas líticas como la collagenasa y reforzar la actividad fagocítica celular (Dinarello, 1996). Además, la IL-1 y FNT- α estimulan la actividad de los osteoclastos (Thomson y cols., 1987; Kobayashi y cols., 2000; Graves y Cochran, 2003) y promueven la liberación a partir de los tejidos de metaloproteinasas de matriz (MMPs), que son enzimas destructivas para la matriz extracelular de la encía, ligamento periodontal y hueso alveolar (Dayer y cols., 1985; Brenner y cols., 1989).

Adicionalmente, la IL-1 y FNT- α inducen la producción de quimioquinas y regulan moléculas de adhesión en los leucocitos y células endoteliales (Graves y Cochran, 2003), dando como resultado la atracción quimiotáctica de leucocitos hacia el lugar de la inflamación.

1.3.1. Interleucina 1- β

La IL-1 es una citocina pro-inflamatoria producida en el sitio de la infección por células involucradas en la defensa del huésped contra los patógenos periodontales, tales como macrófagos, neutrófilos y fibroblastos gingivales (Takahashi y cols., 1995; Lo y cols., 1999), así como monocitos y células B activadas policlonalmente (Murphy y cols., 2000).

Hay dos formas principales de IL-1 que tienen actividad agonista, la IL-1 α e IL-1 β , con un tercer ligando, el antagonista de receptor de IL-1(IL-1ra), que funciona como un inhibidor competitivo. La IL-1 α e IL-1 β tienen normalmente actividades similares (Graves y Cochran, 2003; Dinarello, 1996).

La IL1- β es liberada como parte de los mecanismos que buscan combatir la infección inicial. Sin embargo, la infección persistente lleva a un desequilibrio del sistema inmune y estimula una cascada de eventos, que ha sido iniciada por la IL1- β y que se traduce en la inflamación crónica de los tejidos de soporte periodontal, culminando en la destrucción del hueso alveolar mediada por la regulación de la IL1- β sobre los osteoclastos (Graves y Cochran, 2003).

Entre los efectos de la expresión de IL-1 β se encuentran la estimulación del reclutamiento y activación de los osteoclastos así como el estímulo a los fibroblastos para

que produzcan MMPs, las cuales activan la vía extracelular de destrucción del tejido conectivo, que es un evento temprano en la patogénesis de la enfermedad periodontal.

Además, la IL-1 regula la expresión de la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1), de la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y de E-selectina, las cuales hacen posible que los leucocitos se unan y penetren a través de la pared vascular en el área de inflamación (Scholz y cols., 1996). Este efecto es complementado con el aumento de la permeabilidad vascular a la IL-6, la cual suma sus efectos al de la IL-8, liberada por los leucocitos atraídos a la zona (Stathopoulou, 2009), continuando así con la amplificación de la respuesta inflamatoria.

1.3.2. Factor de Necrosis Tumoral- Alfa (FNT- α)

El FNT se refiere a dos proteínas asociadas, FNT- α y linfotoxina, también conocida como FNT- β (Delima y cols., 2001). El FNT- α es una reconocida citocina pro-inflamatoria en periodontitis, capaz de estimular la degradación de la matriz del tejido conectivo y resorción ósea directa e indirectamente (Tervahartiala y cols., 2001; Kurtis y cols., 2005).

El FNT- α regula la síntesis de collagenasa y PGE2 y se cree que lleva a la pérdida de inserción por medio de mecanismos mediados por proteasas (Gemmell y cols., 2000). Además, entre los efectos de la liberación del FNT- α , se encuentra la producción de RANTES (quimiocina secretada por una variedad de células, entre las cuales se encuentran células del músculo liso, células epiteliales, células T, macrófagos y plaquetas) (Kovacic y cols., 2010). RANTES ejerce una multitud de efectos proinflamatorios y es importante en la quimio-atracción de células T y monocitos, proliferación de células T y respuestas de hipersensibilidad de tipo tardío.

Los niveles de FNT- α son característicamente elevados en el periodonto enfermo, donde son determinante crítico de la destrucción del tejido como consecuencia de sus propiedades proinflamatorias y de reabsorción ósea (Engelbreton y cols., 1999; Garlet y cols., 2004; Graves y Cochran, 2003).

1.4. Estado antioxidante del FCG

Las bacterias implicadas en la periodontitis causan destrucción del tejido conectivo y hueso. Un resultado de la estimulación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) por los antígenos bacterianos, es una aumentada liberación de radicales libres como parte de la respuesta del huésped a la infección, culminando en un incrementado daño oxidativo a los tejidos gingivales, ligamento periodontal y hueso alveolar (Pendyala y cols., 2008). El daño mediado por los radicales libres puede ser mitigado por el “sistema antioxidante de defensa” (Teng, 2003). Sin embargo, ante una situación de sobreproducción de radicales libres o ante una defensa antioxidante insuficiente, se rompe el equilibrio, causando unos efectos deteriorantes, situación conocida como “estrés oxidativo” (Brock y cols., 2004).

El estrés oxidativo juega un papel crucial en el daño de los tejidos periodontales como resultado de la interacción del huésped con el biofilm dental, ya sea como resultado directo de una excesiva actividad de las especies reactivas del oxígeno (ERO), una deficiencia antioxidante o por la activación de factores de transcripción (factor nuclear κ B y proteína activadora 1) y creación de un estado pro-inflamatorio.

La capacidad antioxidante del FCG consecuentemente también se ve comprometida en la periodontitis (Chapple y cols., 2007). En este compromiso parece tener un papel

primordial la respuesta inflamatoria e inmune del paciente (Chapple y cols., 2007). La ruptura del equilibrio redox puede conducir a un daño que se ve incrementado por las ERO. Estudios previos han mostrado que la defensa antioxidante está reducida en la periodontitis crónica, y el tratamiento no quirúrgico con mejoras en los parámetros clínicos puede aumentar dicha defensa antioxidante en los pacientes (Brock y cols., 2002; Tsai y cols., 2005a).

1.5. Tratamiento convencional no quirúrgico de la periodontitis crónica

El tratamiento de la periodontitis crónica involucra principalmente la remoción de la placa y el biofilm que esta contiene, a nivel supra y subgingival. Esta remoción se realiza por medios mecánicos, como sucede en las terapias periodontales no quirúrgicas, mediante raspado y alisado radicular (RAR) (Cobb, 1996; Greenstein, 2000).

La eliminación completa del biofilm en las bolsas periodontales es difícil de lograr, especialmente en las bolsas de mayor profundidad (Walker y Ash, 1976; Buchanan y Robertson, 1987). El objetivo realista de dicho tratamiento sería disminuir la concentración bacteriana hasta un punto en el que el paciente mediante unas correctas técnicas de higiene oral, fuera capaz de prevenir la recolonización (O`Leary, 1986).

El RAR es la técnica “*Gold Standard*” que se realiza con dicho objetivo, porque disminuye la concentración bacteriana, el flujo del fluido gingivocrevicular y hace que el pH retorne a un estado neutro. Disminuyen las principales especies periodontopatógenas, pero no desaparecen porque han podido llegar a invadir hasta 1mm de tejidos blandos. A su vez, influyen en el correcto RAR la destreza del operador, la anatomía dentaria y la evolución de la enfermedad periodontal (Brayer y cols., 1989).

La instrumentación puede realizarse utilizando instrumentos manuales adecuados a la morfología radicular. En esta, la sensibilidad del operador es buena, no genera aerosoles, elimina cemento de la raíz, pero por otro lado, lleva más tiempo y el acceso a furcas y fondo de la bolsa no siempre es posible. Por otro lado, la instrumentación también puede ser sónica (presión neumática que hace que la punta vibre a baja frecuencia) y ultrasónica (donde hay una conversión de energía eléctrica en mecánica, haciendo vibrar la punta con alta frecuencia) (Sbordone y cols., 1990). El raspado puede realizarse por cuadrantes, sextantes, hemiarcada o boca completa “*full mouth*”.

A pesar de que el tratamiento periodontal no quirúrgico puede producir significativa mejoría clínica en la mayoría de los casos, ninguna de las actuales técnicas de instrumentación es efectiva en la eliminación completa de cálculo y bacterias subgingivales (Adriaens y Adriaens, 2004). Por este motivo y para facilitar la disminución de bacterias, especialmente en casos en los que no se ha presentado una adecuada respuesta al tratamiento mecánico convencional, se han utilizado métodos complementarios, tales como antisépticos, antibióticos locales y sistémicos. Estas sustancias son muchas veces difíciles de mantener en concentraciones terapéuticas en la bolsa periodontal, además de que se puede presentar el desarrollo de resistencia antibiótica de los patógenos (Braun y cols., 2008). Este inconveniente se suma a la resistencia reforzada que presentan las especies microbianas por encontrarse dentro de la estructura del biofilm de la placa dental (Feres y cols., 2001). Estos problemas han llevado a la investigación de mecanismos alternativos de terapia antimicrobiana periodontal, entre los cuales se encuentra la Terapia Fotodinámica (TFD).

1.6. Terapia Fotodinámica: mecanismo de acción.

La terapia fotodinámica (TFD) fue introducida en la terapia médica en 1904 como la inactivación inducida por luz a células, microorganismos o moléculas.

La TFD es una técnica terapéutica que involucra la aplicación tópica o sistémica de una sustancia fotosensibilizadora que se une a las células diana y que es activada por luz visible a una longitud de onda apropiada (incluida dentro del espectro de absorción de la sustancia fotosensibilizadora) en presencia de oxígeno (Von Tappeiner y Jodlbauer, 1904) (Figura 1). La exposición del fotosensibilizador a la luz origina su activación, pasando a un estado triplete energizado. El tiempo de vida de este estado permite la interacción del fotosensibilizador activado con las moléculas circundantes y es en este estado en el que ocurre la generación de las especies citotóxicas.



Figura 1.- Tratamiento con Periowave (Ondine Biopharma). A) Irrigación de la bolsa periodontal con azul de metileno, B) Posterior activación del fotosensibilizador con láser de diodo a 670 nm.

El producto citotóxico, usualmente oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) tiene un tiempo de vida corto en los sistemas biológicos ($< 0,04 \mu\text{s}$) y de ese modo, tiene un corto radio de acción ($0,02 \mu\text{m}$). Debido a esta migración limitada del oxígeno singlete desde su sitio de formación, los sitios de daño celular inicial de la TFD están estrechamente relacionados

con la localización del fotosensibilizador, haciéndola ideal para su aplicación local, sin daño a moléculas, células u órganos distantes (Moan y Berg, 1991; Peng y cols., 1996).

Las especies citotóxicas generadas, entre ellas principalmente ($^1\text{O}_2$), causan daño a los lípidos de membrana, destrucción de proteínas y canales de iones, eliminación de importantes enzimas metabólicas, aglutinación de células e inhibición de factores de virulencia exógenos como el lipopolisacárido, la colagenasa y la proteasa así como daño al ADN de los microorganismos, llevando a su muerte y reduciendo de este modo la población bacteriana en la bolsa periodontal (Walsh 2003, El-Yazami y cols., 2010).

Aunque la TFD es más conocida por su aplicación en el tratamiento de neoplasmas (Dougherty y Marcus, 1992), hay un interés creciente como TFD antimicrobiana, debido a su acción bactericida descrita en numerosos trabajos realizados *in vitro* (Martinetto y cols., 1986; Wilson y cols., 1992). Además, porque se ha observado que el potencial de algunos factores de virulencia (lipopolisacáridos y proteasas) también es reducido por la acción de la fotosensibilización (Kamerik y cols., 2000).

1.7. Fuentes de luz utilizadas

Para la inactivación de las bacterias se han usado fuentes de luz coherentes (láseres) y no coherentes (lámparas y diodos emisores de luz -LEDs-) (Peng y cols., 1996).

El láser es visto como una fuente ideal para la inactivación fotodinámica de bacterias, debido a sus propiedades de monocromaticidad y coherencia temporal y espacial (Takasaki y cols., 2009; Peng y cols., 1996). La monocromaticidad es la propiedad que permite la irradiación con la longitud de onda exacta a la cual la sustancia fotosensibilizante tiene su

absorción máxima. La coherencia ofrece la posibilidad de enviar la luz a través de fibras ópticas a las áreas contaminadas escogidas.

El láser continuo de baja potencia, es una fuente de luz utilizada en TFD, que en sí mismo no es letal para las bacterias, pero logra la generación fotoquímica de especies reactivas del oxígeno citotóxicas *vía* fotoactivación del fotosensibilizador.

Estudios anteriores han indicado que la terapia de láser de bajo nivel (basada en el propio efecto fototerapéutico de la radiación láser de baja energía) puede influir positivamente en varios procesos asociados con la reparación de tejidos tales como disminución de la inflamación, fuerza tensil de la herida, reducción del tamaño de la herida, del tiempo de cicatrización y estimulación de la síntesis de colágeno (Woodruff y cols., 2004).

1.8. Ventajas de la TFD en el tratamiento periodontal.

La terapia fotodinámica puede ser utilizada en el campo de la Odontología en el control de patógenos periodontales, desinfección de conductos radiculares, tratamiento de algunas infecciones orales, como la estomatitis inducida por uso de prótesis y en el tratamiento de neoplasias orales.

En cuanto al tratamiento de la infección periodontal, parece improbable el desarrollo de resistencia por parte de los periodontopatógenos ante la TFD, debido a que el oxígeno singlete y todos los otros radicales libres que se originan en esta terapia interactúan con las diversas estructuras celulares microbianas por diferentes mecanismos (Konopka y Goslinski, 2007). Adicionalmente, esta terapia tiene otras ventajas en el tratamiento de infecciones, como el amplio espectro de acción, la habilidad para promover la actividad

citotóxica contra una amplia variedad de microorganismos y un bajo potencial mutagénico en las células expuestas (Jori y cols., 2006).

Otra ventaja de la TFD en el tratamiento de la periodontitis es que debido a que la sustancia fotosensibilizadora pasa a través del epitelio y tejido conectivo (Kömerik y cols. 2003), la terapia tiene efecto sobre importantes periodontopatógenos que tienen la capacidad de invasión a los tejidos periodontales como el *Agreggatibacter Actinomycetemcomitans* (Ramos de Oliveira y cols., 2009).

Además de estas ventajas, la TFD puede ejercer un efecto positivo en los procesos de inflamación, cicatrización de tejidos blandos y óseos y efectos colaterales como el dolor post-operatorio e hipersensibilidad dental post-tratamiento (Bjordan y cols., 2006; Yilmaz y cols., 2002). Así mismo, se han obtenido resultados positivos en la eliminación bacteriana de superficies de implantes humanos, al eliminar o disminuir la población de patógenos periodontales como *P. gingivalis*, *P. intermedia* y *A. actinomycetemcomitans*, como se ha podido demostrar en anteriores estudios (Haas y cols., 1997; Dörtbudak y cols., 2001).

1.9. Estudios previos aplicando TFD al tratamiento de la periodontitis crónica

Cuando la TFD se realiza como único tratamiento, son esperables depósitos mineralizados remanentes en la superficie radicular. Este cálculo subgingival residual puede servir como base de fijación de bacterias y contribuir al desarrollo de la bolsa periodontal y a la progresión de la enfermedad periodontal (Bernimoulin, 2003). Es por ello, que de forma general, en los estudios descritos en la literatura, los pacientes recibieron TFD en los dientes periodontalmente afectados, como complemento del RAR.

Teniendo en cuenta los datos disponibles en otros estudios clínicos publicados, parece ser que en pacientes con PC, el uso de la TFD como complemento del RAR, puede resultar en mayores reducciones del sangrado al sondaje en comparación con RAR, en un plazo corto (hasta 3 o 6 meses); además puede resultar en una reducción de PS y aumento de los niveles de inserción clínica comparables con los obtenidos tras la realización de RAR únicamente (Christodoulides y cols., 2008; Chondros y cols., 2009; Polansky y cols., 2009; Ge y cols., 2011). Del mismo modo, tanto los procedimientos de tratamiento (RAR ó RAR + TFD) revelan cambios microbiológicos similares en los patógenos periodontales más comunes (Yilmaz y cols., 2002; Chistodoulides y cols., 2008; Polansky y cols., 2009). La mayor mejoría en cuanto a la reducción del sangrado puede atribuirse en parte, al efecto adicional de foto-biomodulación mediada por la radiación láser de baja potencia, aplicada durante la terapia fotodinámica (Qadri y cols., 2005).

Un estudio reciente de 10 pacientes con la terapia periodontal de apoyo, con 70 bolsas residuales ($PS \geq 5$ mm) y un diseño de grupos paralelos, ha confirmado los efectos positivos de episodios de TFD repetidos complementando al tratamiento de RAR en las bolsas periodontales tratadas, como una mayor reducción de PS, aumento de los niveles de inserción clínica y disminución del sangrado al sondaje a los 6 meses post-tratamiento (Lulic y cols., 2009). Estos resultados positivos podrían estar relacionados con el protocolo del estudio: RAR de las bolsas residuales y a continuación aplicación inmediata de TFD, repitiendo esta secuencia de tratamiento cinco veces en dos semanas.

Algunos estudios sugieren que el sangrado al sondaje puede ser considerado como un indicador objetivo de la inflamación gingival (Chaves y cols., 1993). De esta manera, los resultados publicados después de RAR complementado con TFD muestran una tendencia a reducir el sangrado al sondaje o el PSBT (Porcentaje de sangrado en bocal total), hecho que

podría estar relacionado con una tendencia a reducir la inflamación. Cabe señalar que apenas hay estudios en la literatura sobre TFD y las citocinas proinflamatorias, salvo el estudio de Oliveira, donde la investigación de los niveles de citocinas en el FCG de pacientes con periodontitis agresiva después de TFD o RAR mostró que ambas modalidades de tratamiento reducían significativamente los niveles de FNT- α y del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) tras el tratamiento (de Oliveira y cols., 2009). Recientemente, exámenes histológicos de los tejidos periodontales de ratas tratadas previamente (1 mes antes) con TFD mediada la fotosensibilización con azul de toluidina, mostraron una mayor reducción de las reacciones inflamatorias (reducción de la infiltración de células inflamatorias, principalmente linfocitos) que en los tejidos periodontales tratados convencionalmente (Qin y cols., 2008).

Al interpretar los datos disponibles en la literatura, es evidente que estudios clínicos aleatorios controlados, evaluando los beneficios clínicos, microbiológicos y potencial inmunológico de la TFD en el tratamiento de la periodontitis, son todavía limitados. Las principales dificultades que estos estudios entrañan pueden estar relacionadas con un número bastante limitado de pacientes, la corta duración de los estudios (es decir, 3 ó 6 meses) y el hecho de que todavía no ha sido establecido el protocolo más efectivo de TFD. Desde su introducción en el campo periodontal, la TFD aplicada complementariamente parece mejorar algunos aspectos de la enfermedad periodontal, pero se necesitan estudios clínicos *in vivo* más sistemáticos y a más largo plazo que investiguen los efectos clínicos, inmunológicos y bactericidas después de su aplicación en una única dosis o en dosis repetidas de TFD para aclarar los posibles beneficios.

1.10. Futura perspectiva de la TFD

En muy pocos años la TFD ha progresado enormemente en el campo biomédico. En este momento son numerosos los grupos de investigación que se encuentran trabajando en este campo investigando su aplicación. Por una parte, se están desarrollando nuevos fotosensibilizadores que se eliminen más rápidamente de los tejidos sanos, que actúen a dosis más bajas y que absorban a mayor longitud de onda, permitiendo una mayor penetración de la luz, por ello requiriéndose menores dosis de fotosensibilizador, a la vez que se están desarrollando nuevas fuentes de irradiación. Todo este esfuerzo investigador que se está llevando a cabo en estos momentos permite predecir que la TFD tiene ante sí un futuro muy prometedor y dado los pocos efectos secundarios que presenta, puede convertirse dentro del campo del tratamiento de la enfermedad periodontal en un tratamiento complementario ambulatorio y ordinario en la práctica odontológica.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Algunos estudios llevados a cabo anteriormente han demostrado que la aplicación de Terapia Fotodinámica conlleva una mejoría clínica en las condiciones periodontales de los pacientes tratados previamente con RAR. Sin embargo, permanece aún sin establecer cuál es el calendario de tratamiento con este tipo de terapia que ofrece las mayores ventajas en cuanto a resultados clínicos.

En este trabajo proponemos que el RAR complementado con aplicaciones únicas o repetidas de TFD en pacientes con periodontitis crónica produce diferentes resultados clínicos. Se supone que la mejoría clínica debería acompañarse de mejoría de los hallazgos inmunológicos y de la respuesta antioxidante total a nivel del FCG, cuando se realiza la TFD de manera complementaria en una única sesión o en sesiones repetidas.

2.2. Objetivos

Los recientes progresos tecnológicos conducen a un continuo desarrollo de nuevas técnicas para tratar la enfermedad periodontal. La necesidad de encontrar tratamientos optimizados es el objetivo a medio plazo de científicos y periodoncistas. En este sentido, la introducción de TFD en el manejo de la enfermedad periodontal parece presentar sutiles ventajas en cuanto a la disminución del sangrado y eliminación bacteriana, lo que podría conllevar una mejoría del proceso inflamatorio y a una modulación de la capacidad antioxidante a medio plazo. A pesar de estas observaciones, la aplicación clínica de la TFD en Periodoncia sigue siendo limitada (tanto empleada como monoterapia o bien como terapia complementaria aplicada en una única dosis o en dosis repetidas) y son también

escasos los estudios publicados que evalúen sus efectos sobre los aspectos clínicos, inmunológicos y antioxidantes. Además, se hace necesaria la búsqueda del establecimiento consensuado de un patrón de aplicación de este tipo de terapia emergente (dosis de fotosensibilizador, potencia de la radiación láser aplicada, tiempo de exposición a la radiación y frecuencia de la aplicación, entre otros) para poder comparar los resultados publicados.

Con base en estas consideraciones, el **objetivo principal** del presente estudio es la evaluación “in vivo” a nivel clínico, inmunológico y antioxidante de la TFD aplicada en una única sesión o en sesiones repetidas en combinación con el tratamiento convencional no quirúrgico (RAR), frente a los resultados obtenidos tras la aplicación de RAR como monoterapia en casos de periodontitis crónica.

Como **objetivos específicos** se han planteado:

- Analizar las diferencias clínicas encontradas a lo largo del tiempo de estudio entre los tres tipos de tratamiento mediante la cuantificación de los parámetros clínicos seleccionados con tal fin: profundidad de sondaje (PS), porcentaje de sangrado en boca total (PSBT) y porcentaje de placa en boca total (PPBT).
- Analizar la evolución de los cambios inmunológicos y diferencias entre los tres tipos de tratamiento mediante la cuantificación de los niveles de IL-1 β , FNT- α y del estado antioxidante total en el FCG.
- Estudiar la dependencia de estos efectos con la frecuencia de aplicación de la TFD: dosis única o repetida en varias sesiones.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño del estudio y población estudiada

El presente trabajo consistió en un estudio clínico longitudinal donde la respuesta al tratamiento periodontal convencional fue comparada con la obtenida al complementar dicho tratamiento con terapia fotodinámica aplicada en una única dosis o en dosis repetidas, en pacientes con PC del adulto.

Esta investigación fue llevada a cabo en el Departamento de Estomatología III de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid. La población del estudio fue seleccionada dentro del grupo de usuarios del servicio clínico de esta facultad. Además, en estas instalaciones se realizaron todos los procedimientos clínicos y de laboratorio descritos en la metodología del trabajo. Los resultados obtenidos fueron procesados en el Departamento de Baja Dimensionalidad, Superficies y Materia Condensada del Instituto de Química y Física Rocasolano, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid.

Después de realizar la valoración clínica de 45 pacientes, 16 fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión. Fueron seleccionados 29 sujetos como muestra de esta investigación, pero a lo largo del desarrollo del protocolo, 2 de los sujetos fueron retirados del estudio, debido a que no acudieron a las sesiones de control programadas o a que incumplieron las indicaciones sugeridas por los investigadores como parte del protocolo de trabajo. Este trabajo se realizó entre Noviembre de 2010 y Julio de 2012.

De esta forma, la muestra poblacional consistió en 27 sujetos (18 mujeres y 9 hombres) de 25 a 62 años de edad, con una edad media de $47,5 \pm 9,3$ años, con PC moderada. Los sujetos participantes fueron distribuidos en tres grupos para seguir tres tipos de tratamiento

diferentes: “RAR”, RAR complementado con TFD única “RAR+TFD” y RAR complementado con TFD repetida “RAR+TFDr”. La asignación se realizó aleatoriamente mediante un método de asignación al azar de sobres numerados. La secuencia de tratamiento correspondiente a cada grupo no fue desvelada hasta la realización de las primeras aplicaciones láser.

Para asegurar el carácter ciego del estudio, los pacientes fueron evaluados por un examinador y tratados por otro profesional. Las muestras analizadas fueron también cegadas en el laboratorio donde se procesaron.

3.1.1. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión considerados para la selección de la muestra fueron: presencia de tres o más dientes unirradiculares por cuadrante en cada uno de los cuales hubiera al menos una localización con profundidad de sondaje entre 3 y 6 mm. Además, que no tuvieran restauraciones de clase III o IV, ni coronas, así como que no fueran apoyo de aparatos protésicos. Presencia de al menos seis dientes con una profundidad de sondaje superior a 4 mm.

3.1.2. Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión establecidos fueron: pacientes fumadores, pacientes sometidos a tratamiento con antibióticos, antiinflamatorios, corticoides u otro tipo de medicamento que afectara el estado periodontal, así como colutorios antisépticos durante los tres meses anteriores al momento de iniciar el estudio; pacientes en periodo de embarazo o lactancia; pacientes con enfermedades sistémicas que afectaran la salud periodontal y/o el desarrollo del protocolo de estudio y pacientes que hubieran recibido

tratamiento periodontal en los tres meses anteriores al inicio de su participación en el estudio.

3.2. Aspectos éticos

Todos los participantes fueron informados acerca de las características del procedimiento, riesgos y beneficios del tratamiento al cual se iban a someter y en ese momento decidieron voluntariamente enrolarse en el estudio firmando el correspondiente Consentimiento Informado. Este estudio cuenta con la aprobación de la Unidad de Coordinación de Ensayos Clínicos del Hospital San Carlos de Madrid, con fecha de 25 de junio de 2009 (Código interno: E-09/253).

3.3. Mediciones clínicas: porcentaje de placa en boca total, porcentaje de sangrado en boca total y profundidad de sondaje.

Las mediciones clínicas, llevadas a cabo por un odontólogo experto calibrado, se realizaron en cada participante antes de iniciar el tratamiento y a las 4 y a las 8 semanas después de la realización del tratamiento periodontal básico “RAR”.

La calibración del examinador se logró al obtener una reproducibilidad de las observaciones clínicas mayor del 90%, en cinco pacientes externos al estudio a los que se les realizó dos periodontogramas en un intervalo de 48 horas.

Los parámetros clínicos se estudiaron en seis localizaciones para cada diente, a excepción de los terceros molares: mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiolingual, lingual y distolingual.

Las mediciones para obtener el porcentaje de placa en boca total (PPBT) se hicieron utilizando una sonda exploratoria de caries N° 23 para detectar la presencia o ausencia de esta, la cual se registró en forma dicotómica en las seis superficies de cada diente (modificada de Silness y Löe, 1964). Posteriormente se llevó a cabo una limpieza supragingival superficial para facilitar el posterior sondaje.

Las mediciones de profundidad de sondaje (PS) se realizaron utilizando una sonda periodontal manual estandarizada (CP15 UNC; Hu-Friedy Instrument Co, Chicago IL, USA). La presencia de sangrado en las localizaciones se observó simultáneamente con la profundidad de sondaje, a los 30 segundos después de retirar la sonda periodontal mediante prueba dicotómica (sangrado, no sangrado) en las seis localizaciones dentarias donde se hizo la exploración. Estas fueron utilizadas para calcular el porcentaje de sangrado en boca total (PSBT).

3.4. Recolección de la muestra de FCG

Se tomaron muestras de FCG de cuatro dientes unirradiculares, escogiendo la localización con mayor PS en cada cuadrante de cada participante, sin que dicha PS excediese los 6 mm.

Se realizó el aislamiento de la localización escogida para la toma de muestra utilizando rollos de algodón y eyector. En cada localización seleccionada, se retiró la placa

supragingival limpiando suavemente con un rollo de algodón y evitando el contacto con el margen gingival para prevenir el sangrado. Adicionalmente se realizó un secado suave con chorro de aire. Posteriormente se introdujo en la bolsa periodontal una punta de papel prefabricada (Periopaper, Oraflow INC, Plainview, NY, USA) en dirección paralela al eje del diente hasta que el examinador percibió una resistencia leve. La punta de papel siempre permaneció insertada durante 30 s., para normalizar la cantidad de FCG absorbida. Las puntas contaminadas con sangre o saliva fueron descartadas y se repitió la toma de muestra en la localización que hubiese sangrado tras comprobar la ausencia de sangrado.

El volumen de FCG absorbido por la punta de papel fue determinado utilizando un equipo Periotron 8000 (Pro-Flow Inc., Amityville, New York, USA). Las medidas obtenidas fueron convertidas en volumen actual (μL) utilizando para la conversión una curva de calibrado realizada previamente con suero de pacientes humanos sanos y ajustada a una regresión polinómica de cuarto orden (Chapple y cols. 1999).

Las muestras de FCG satisfactorias se almacenaron en viales estériles con filtro, a una temperatura de -80°C , hasta su posterior análisis en laboratorio.

Las muestras de FCG fueron tomadas antes de iniciar el tratamiento (día 0 del estudio), para analizar IL-1 β , FNT- α y EAT, así como a las 4 y 8 semanas después del tratamiento, en las mismas localizaciones y siguiendo el mismo protocolo.

3.5. Procesado de las muestras

Las muestras de FCG fueron procesadas en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

3.5.1. Determinación de IL1- β y FNT- α

Muestras diluidas de FCG se analizaron para determinar la concentración de estos dos mediadores inflamatorios mediante la prueba de ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

Los niveles de IL1- β y FNT- α fueron determinados por duplicado mediante los kits comerciales BLK224 y BLK223, de Biolink (Biolink 2000 S.L., Barcelona, España), respectivamente. Todos los procesos de laboratorio fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las cantidades de citocina por muestra se calcularon a partir de curvas estándar creadas para cada kit. Se calculó la concentración de cada citocina en cada localización analizada, dividiendo la cantidad de citocina determinada por ELISA para esa localización entre el volumen de FCG extraído de dicha localización, (calculado previamente a partir de la curva de calibrado del Periotron 8000). Las concentraciones se expresaron en pg/ μ L.

3.5.2. Estado antioxidante total del FCG

La determinación del estado antioxidante total del FCG se midió mediante el test fotométrico (ImAnOx (TAS) Kit, Immundiagnostik AG, Stubenwald-Alle 8a, D64625 Bensheim). Esta determinación se basa en la reacción de los antioxidantes de la muestra con una cantidad definida de peróxido de hidrógeno proporcionado exógenamente (H_2O_2). Los antioxidantes de la muestra eliminan una cantidad del H_2O_2 suministrado. El H_2O_2 residual se determina fotométricamente mediante una reacción enzimática que implica la conversión de 3,3',5-5'- tetrametilbencidina (TMB) en un producto coloreado. Las muestras se miden a 450 nm y son expresadas en μ mol/L.

3.6. Procedimientos clínicos

3.6.1. Tratamiento periodontal básico.

Todos los sujetos participantes en el estudio recibieron tratamiento periodontal básico incluyendo raspado y alisado radicular e instrucciones de higiene oral. La finalización de dicho tratamiento fue considerado como el día 1 en el diseño de este trabajo de investigación.

El tratamiento supragingival fue realizado utilizando un equipo de ultrasonido SONYflex 2003 de Kavo y su punta universal, aplicado con una inclinación de 20°-30°. El tratamiento sub-gingival se llevó a cabo utilizando curetas de Gracey (Hu-Friedy Co., Chicago, IL, USA). La aparición de una superficie radicular lisa, suave y libre de cálculo, determinada por la sensación táctil con una sonda periodontal (CP15 UNC, Hu-Friedy instrument Co, Chicago, IL, USA), marcó en cada sesión la finalización del proceso. A continuación y para finalizar se procedió a un pulido de las superficies tratadas con una taza de goma y pasta profiláctica Zircate® (Dentsply). Todo el procedimiento de RAR se realizó en dos sesiones consecutivas dentro de un intervalo de 24h. En la primera sesión se realizó la limpieza del 1^{er} y 4º cuadrante y en la segunda sesión del 2º y 3^{er} cuadrante. Se utilizó el tiempo necesario hasta que el operador consideró que estaba correctamente instrumentado. Durante dicho procedimiento los pacientes recibieron anestesia local: lidocaína 2% (Octocaine 1:100.000, Laboratorios Clarben S.A., Madrid).

3.6.2. Programa de higiene oral

Una vez realizado el tratamiento supragingival, los participantes recibieron instrucción y motivación sobre la técnica de cepillado de Bass y el uso de hilo dental y/o cepillos

interproximales. Además, los participantes recibieron instrucciones acerca de cómo detectar la presencia o ausencia de placa en las superficies dentales y poder con esto mejorar y controlar su propia higiene oral en casa. Asimismo, recibieron refuerzo sobre las recomendaciones y motivación para la higiene oral en cada sesión de aplicación de TFD y fueron advertidos de permanecer sin utilizar colutorios durante el tiempo del estudio, para evitar interferencias con los resultados obtenidos.

3.6.3. Terapia Fotodinámica

El fotosensibilizador utilizado consistió en 3,7-bis (dimetil-amino) cloruro de fenazationio (azul de metileno) 0,005% (p/v), suspendido en una solución de tampón fosfato salino con hidroximetilcelulosa como agente de viscosidad mucoadhesivo (Tratamiento Periowave™ Kit, Ondine Biopharma Corporation, Vancouver, BC, Canadá). La solución fotosensibilizante se aplicó directamente en toda la boca con un Dentsply (York, PA, USA) de calibre 23, acabado en una aguja de irrigación para permitir la irrigación completa de la bolsa periodontal (desde el fondo de la bolsa hacia la parte coronal). La solución fotosensibilizante permaneció 3 minutos en contacto con el tejido periodontal. Al cabo de este tiempo, se procedió a irrigar suavemente la superficie del tejido gingival con agua destilada para retirar los excesos de dicha solución. La fotoactivación se llevó a cabo con un láser de diodo (Periowave™, Ondine BioPharma), emitiendo a una longitud de onda de $\lambda = 670$ nm, con una potencia de 200 mW, aplicada en toda la cavidad oral. La radiación se aplica a través de una fibra óptica flexible conectada a una pieza de mano autoclavable de acero inoxidable. La pieza de mano da cabida a una punta difusora de luz configurada de manera similar a una sonda periodontal para permitir el acceso a la bolsa periodontal. Como ya se ha comentado, todos los tratamientos se

realizaron con una potencia continua de 200 mW (comprobada antes de cada tratamiento mediante el empleo de un detector de potencia láser XLP de Gentec en combinación con una consola Gentec-SOLO 2) y tiempo de irradiación de 60 segundos por diente (30 segundos por la cara vestibular y lingual respectivamente, es decir, 10 segundos por localización), que viene determinado como un ciclo de iluminación por el propio sistema láser. La punta difusora de luz se desplazó suavemente alrededor de la bolsa periodontal de cada diente durante cada ciclo de la iluminación. A modo de resumen, la secuencia de tratamiento se muestra en la Figura 2. La aplicación de todo el tratamiento se realizó a boca completa, y aunque la duración de cada sesión no fue controlada ni limitada en el tiempo, cada una de ellas tuvo una duración aproximada de 1 hora. Paciente, operador y los asistentes utilizaron gafas de protección durante la aplicación láser.



Figura 2. A) Kit para la aplicación del fotosensibilizador (azul de metileno), B) Irrigación de la bolsa periodontal con una disolución de azul de metileno, C) Equipo láser de Periowave ($\lambda=670\text{nm}$, 200 mW, 60s/diente), D y E) Fotoactivación láser.

A los nueve pacientes del grupo de Terapia fotodinámica única se les aplicó dicho tratamiento 24 horas después de haber realizado el RAR, en una única exposición.

Por otro lado, los nueve pacientes del grupo de Terapia fotodinámica repetida, fueron sometidos al tratamiento completo de fotosensibilizador más radiación láser los días

2, 4, 5, 8 y 10 del desarrollo del estudio, es decir, cinco sesiones distribuidas durante las dos primeras semanas del estudio.

3.7. Análisis estadístico

Se procedió al análisis estadístico descriptivo de los resultados obtenidos (media y desviación típica). Se analizaron las diferencias en la evolución de los parámetros clínicos e inflamatorios (antes del tratamiento, a las 4 y 8 semanas) entre los tres tipos de tratamientos aplicados: RAR, RAR+TFDs, RAR+TFDr.

Se realizó inicialmente la prueba para determinar la normalidad de la muestra utilizando el test de Shapiro-Wilk, el cual mostró que la muestra no cumplió con los parámetros de normalidad.

Para establecer comparaciones intragrupos (entre post-terapia y estado basal), el test utilizado para el análisis estadístico fue el test no paramétrico de Friedman, considerándose los valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos. Para establecer comparaciones entre los tres grupos se utilizó el test de Kruskal-Wallis, aceptándose los valores de $p < 0.05$ como estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Índices clínicos

Se observó una remisión de la enfermedad periodontal crónica en los tres grupos de tratamiento. No se observaron complicaciones durante el periodo de estudio como abscesos o infecciones, por lo que los tres tipos de tratamiento fueron bien tolerados, al mismo tiempo que no se observaron efectos adversos asociados a la radiación láser como sensación de ardor o dolor.

4.1.1. Porcentaje de placa en boca total (PPBT)

Se encontró una marcada reducción del porcentaje de placa en boca total (PPBT) entre el estado inicial (0 semanas) y la primera reevaluación (4 semanas) en los tres grupos evaluados (RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr) (Figura 3). A las 8 semanas, se mantuvo el descenso en el PPBT en todos los grupos evaluados. Todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el estado inicial y la primera y segunda reevaluación (4 y 8 semanas tras el tratamiento, respectivamente); sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas intergrupos.

4.1.2. Porcentaje de sangrado en boca total (PSBT)

Para valorar la reducción en el sangrado gingival con los tratamientos aplicados, se calculó el porcentaje de sangrado en boca total (PSBT). En este caso también podemos observar como para los tres grupos evaluados su reducción fue más marcada a las 4 semanas del tratamiento (Figura 4), manteniéndose en descenso, aunque menos acusado, hasta las 8 semanas. A diferencia del PPBT, solo el tratamiento con terapia fotodinámica aplicada en varias dosis, mostró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la reducción del sangrado entre el estado inicial y las 4 semanas post-tratamiento. De nuevo, y como también sucedió para el PPBT, todos los tratamientos mostraron diferencias

estadísticamente significativas en la segunda reevaluación (8 semanas del tratamiento) respecto al estado inicial; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas intergrupos.

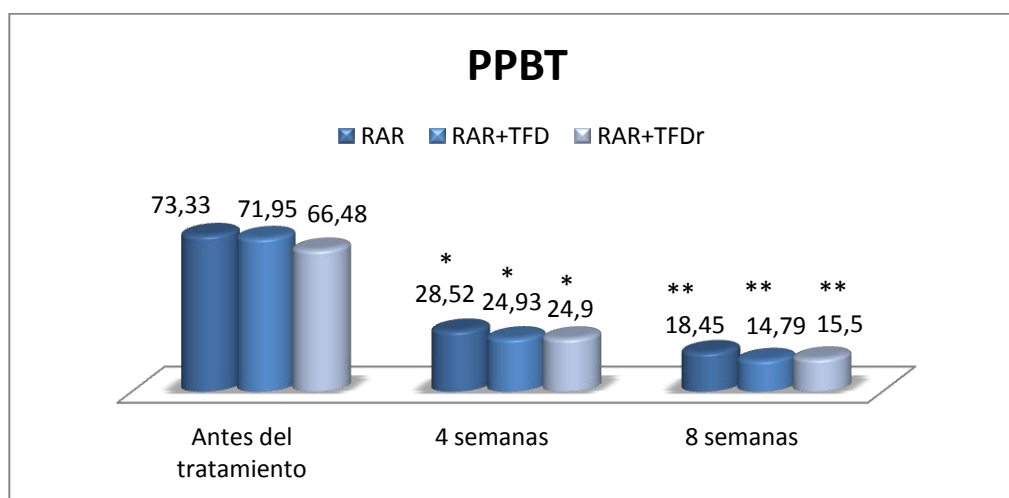


Figura 3- Evolución del PPBT durante el tratamiento en los grupos RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr. Valores expresados en porcentaje.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas.

**: DES respecto al estado inicial a las 8 semanas.

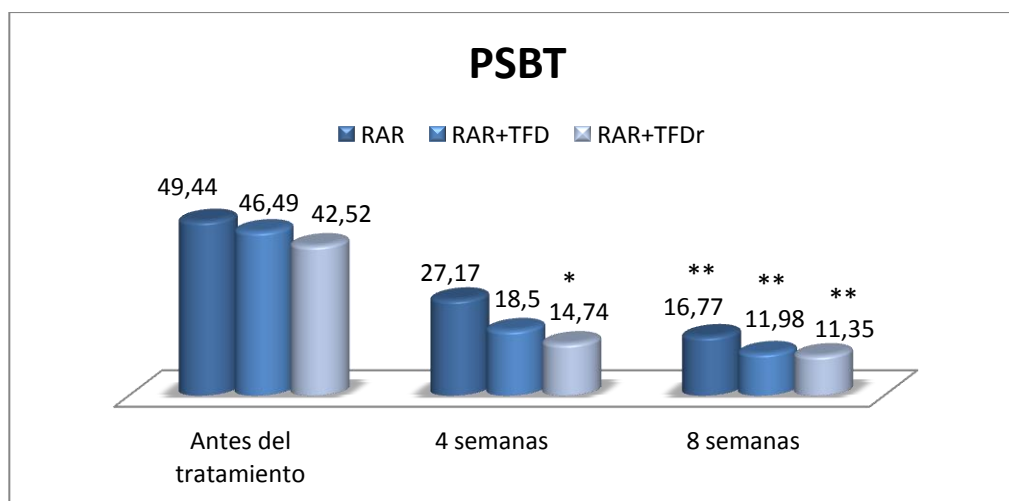


Figura 4- Evolución del PSBT durante el tratamiento en los grupos RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas.

**: DES respecto al estado inicial a las 8 semanas.

4.1.3. Profundidad de sondaje (PS)

Observando la profundidad de sondaje media (PS) de los tres grupos, encontramos que los tres tratamientos resultan efectivos en la reducción de la bolsa. De nuevo, en los tres grupos de tratamiento estudiados RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en las dos reevaluaciones y el estado inicial (Figura 5); no obstante, tampoco aquí encontramos diferencias estadísticamente significativas intergrupos.

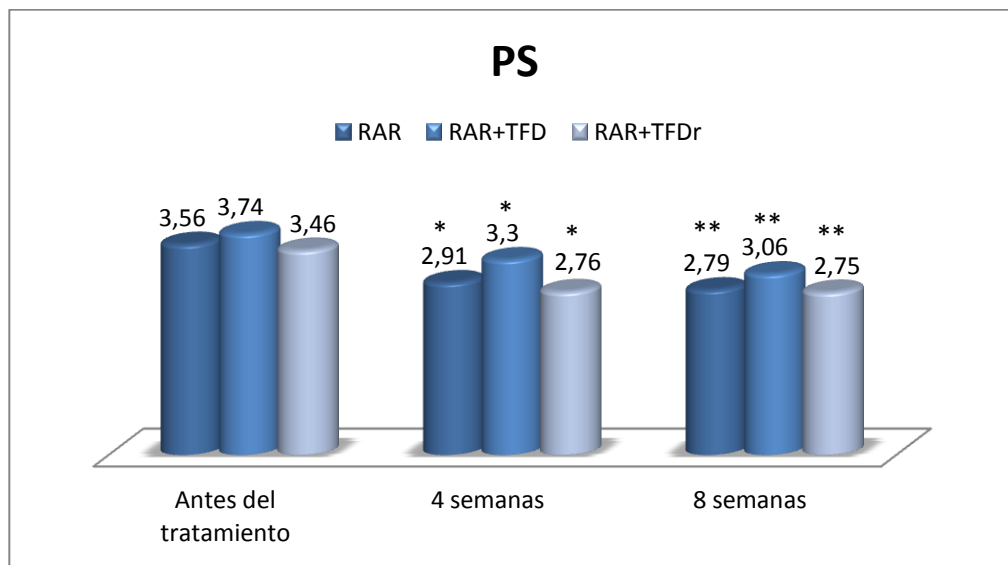


Figura 5- Evolución de la PS durante el tratamiento en los grupos evaluados RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas.

** : DES respecto al estado inicial a las 8 semanas.

Para completar el estudio clínico, se analizó la evolución de la PS en función de la profundidad inicial de la bolsa periodontal (Figura 6). Se observó un descenso significativo de la PS en los tres grupos de tratamiento a partir de la 4ª semana del tratamiento, para bolsas con una profundidad inicial de partida mayor de 3 mm.

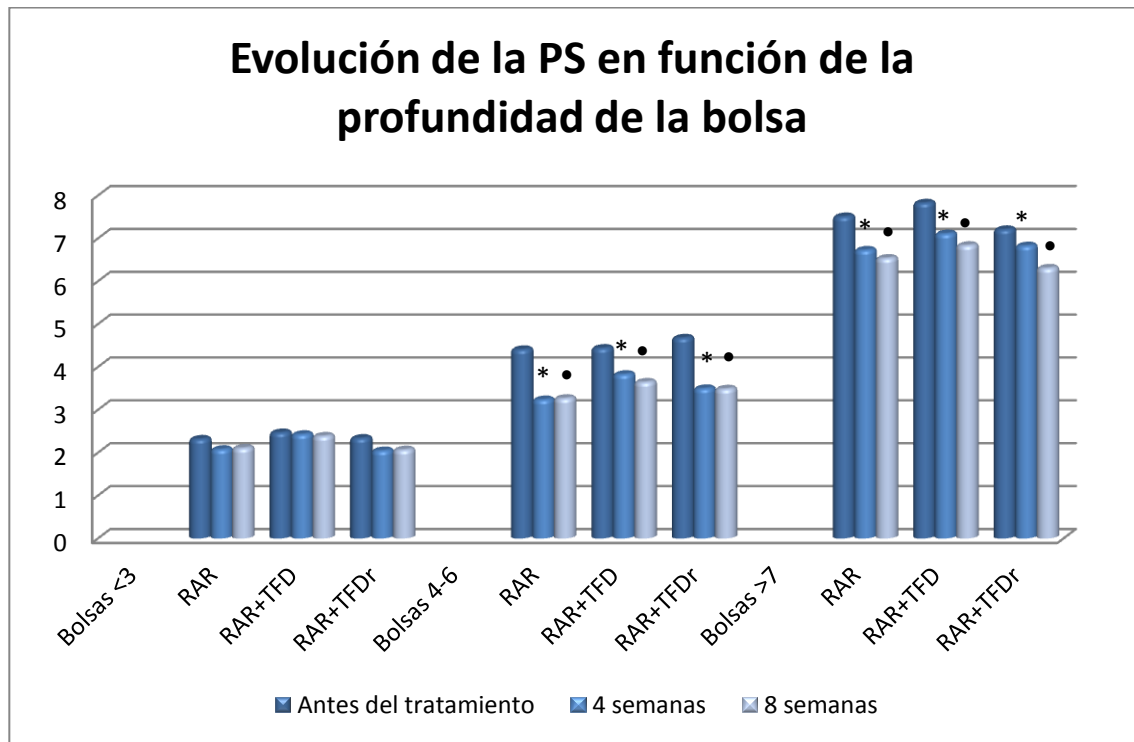


Figura 6- Evolución durante el tratamiento de la PS, en función de la profundidad inicial de bolsa, en los grupos evaluados: RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas.

•: DES respecto al estado inicial a las 8 semanas.

Sin embargo, en este análisis tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas *intergrupos*.

Al mismo tiempo, se analizó la evolución del sangrado en función de la profundidad inicial de la bolsa periodontal (Figura 7), observándose un descenso significativo en los tres grupos de tratamiento y para todas las profundidades evaluadas, a partir de las 4 semanas del tratamiento respecto al estado inicial. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas *intergrupos* en bolsas con profundidad inicial mayor de 7mm, entre el grupo complementado con Terapia Fotodinámica aplicada en dosis repetidas frente a los grupos

RAR y RAR+TFD, a las 4 semanas post-tratamiento y entre los dos grupos complementados con Terapia Fotodinámica frente al grupo de RAR (aplicado en exclusividad), a las 8 semanas post-tratamiento.

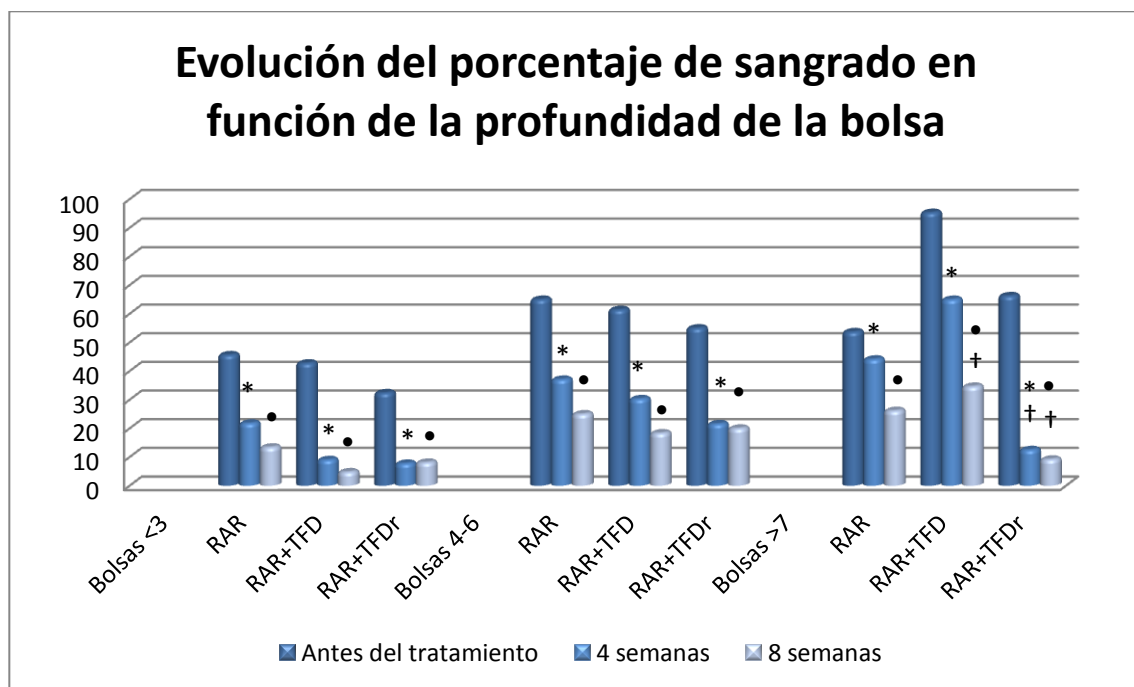


Figura 7- Evolución del porcentaje de sangrado durante el tratamiento, en función de la profundidad inicial en los grupos evaluados: RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas.

•: DES respecto al estado inicial a las 8 semanas.

†: DES intergrupos

Podemos resumir diciendo que el análisis de los parámetros clínicos evaluados nos muestra una mejoría de la enfermedad en los tres grupos de tratamiento, mucho más relevante en las 4 semanas siguientes al mismo y además, que la terapia fotodinámica aplicada complementariamente en una única dosis o en dosis repetidas conlleva un ligero beneficio adicional respecto al tratamiento convencional de raspado y alisado radicular, ya

que resulta en una mayor reducción del sangrado en las bolsas más profundas. Además, la terapia fotodinámica aplicada en dosis repetidas resulta en términos generales en una disminución del PSBT más temprana.

4.2. Mediadores proinflamatorios

4.2.1. Interleucina-1 β (IL-1 β)

El recuento de los niveles de esta citocina pro-inflamatoria en el FCG aumentó progresivamente en el grupo RAR (control), encontrándose niveles más elevados a las 4 y a las 8 semanas. En este grupo de tratamiento, el análisis estadístico detectó diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en las 8 semanas post-tratamiento respecto al estado inicial (Figura 8). En el grupo RAR+TFD se encontraron niveles de IL-1 β ligeramente aumentados a las 4 semanas respecto del estado inicial, para volver a ascender a las 8 semanas, detectándose diferencias estadísticamente significativas entre la última reevaluación (8 semanas) y el estado inicial (Figura 8). Sin embargo, en el grupo RAR+TFDr se observó una clara reducción de los niveles de dicha citocina a las 4 semanas y un ligero repunte a las 8 semanas sin llegar a alcanzar el nivel inicial. Pese a la reducción observada a las 4 semanas, el análisis de los datos no detectó diferencias estadísticamente significativas entre la primera reevaluación (4 semanas) y el estado inicial, dentro de este mismo grupo de tratamiento. Comparando los resultados obtenidos tras los tres tipos de tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los niveles de IL-1 β en el FCG, entre los grupos, pese al efecto ralentizador de la inflamación que parece ejercer la TFD aplicada complementariamente en dosis repetidas.

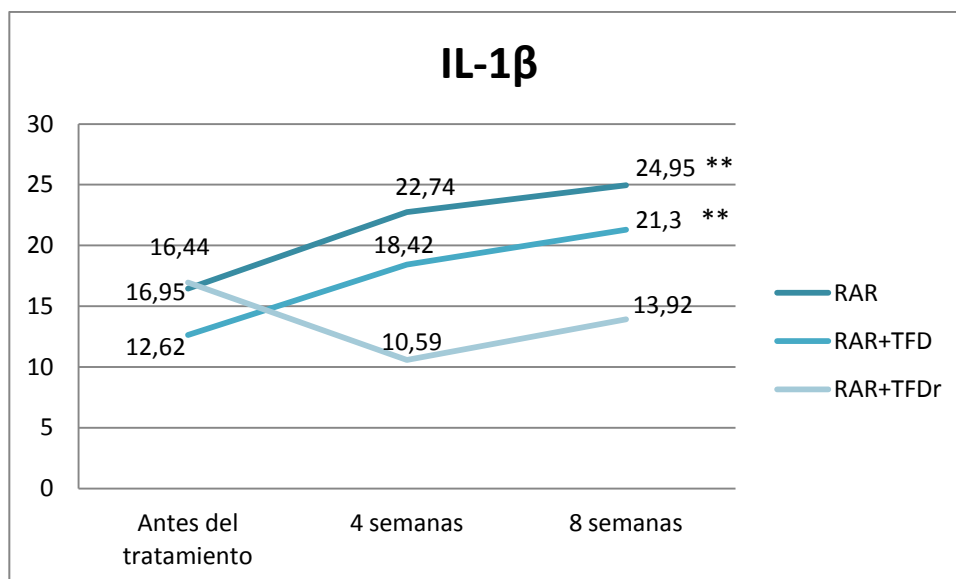


Figura 8- Evolución de los niveles de IL-1 β en el FCG durante el tratamiento en los grupos evaluados: RAR, TFD+RAR y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas

**: DES respecto al estado inicial a las 8 semanas

4.2.2. Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α)

En el grupo RAR (control), los niveles de FNT- α aumentaron tanto a las 4 como a las 8 semanas, siendo en este último registro donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al estado inicial (Figura 9).

En el grupo RAR+TFD, los niveles se elevaron progresivamente, en especial entre las 4 y las 8 semanas, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas en la 4ª y 8ª semanas después del tratamiento, respecto al estado inicial (Figura 9). Finalmente, en el grupo RAR+TFDr sin embargo, sí que se observó un ligero descenso de los niveles a las 4 semanas, para volver a incrementarse a las 8 semanas volviendo casi a alcanzar los niveles iniciales, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas intragrupo. De nuevo, como para el mediador proinflamatorio anteriormente comentado, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados, pese a la tendencia

ralentizadora de la inflamación, que parece tener la TFD aplicada complementariamente en dosis repetidas.

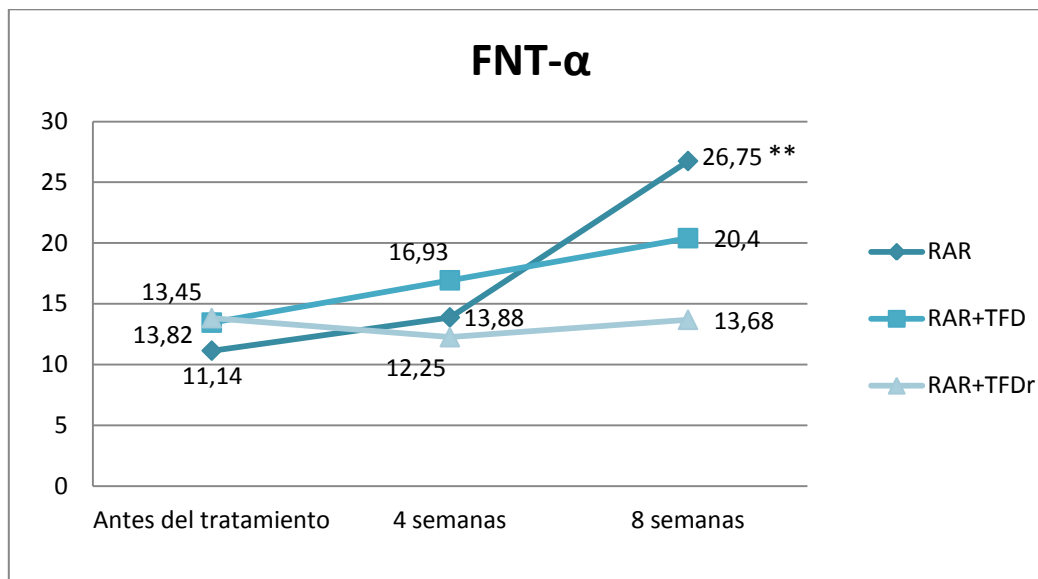


Figura 9- Evolución de los niveles de FNT- α en el FCG durante el tratamiento en los grupos evaluados, RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas

**: DES respecto al estado inicial las 8 semanas

4.3. Estado antioxidante total en FCG

Por último, la Figura 10 muestra los resultados obtenidos en la evolución del estado antioxidante total del FCG tras los diferentes tratamientos aplicados. Podemos observar que dicho estado se mantiene más o menos constante a lo largo del tratamiento para todos los grupos analizados, sin que existan por tanto diferencias estadísticamente significativas en la evolución de dicho estado dentro de cada tipo de tratamiento, ni entre los tratamientos aplicados.

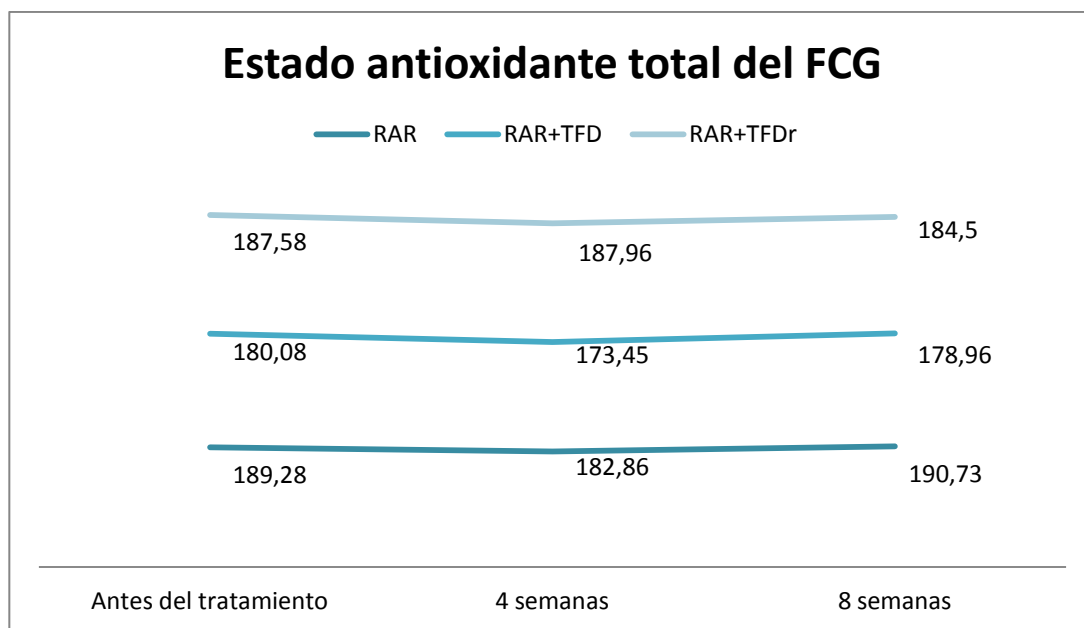


Figura 10- Evolución del estado antioxidante total del FCG durante el tratamiento en los grupos

Evaluados: RAR, RAR+TFD y RAR+TFDr.

*: DES respecto al estado inicial a las 4 semanas.

***: DES respecto al estado inicial a las 8 semanas.

†: DES entre RAR , RAR+TFD y RAR+TFDr.

5. DISCUSIÓN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa, cuyo actual concepto de tratamiento está enfocado en la eliminación de la infección (Page y cols., 1997). Varios estudios han considerado el RAR como requisito básico para el éxito a largo plazo del tratamiento de la periodontitis (Armitage, 1999; Haffajee y cols., 2004). Además, es conocido que los patógenos periodontales también pueden invadir el tejido periodontal y a menudo, aun después del RAR, dar origen por esta vía a la presencia de signos de inflamación. Por este motivo se requieren tratamientos especiales que combinen modalidades mecánicas y anti-infecciosas (Sigusch y cols., 2010).

La TFD es una técnica mediante la cual, tras fotoactivación, una sustancia fotosensibilizadora es excitada de un estado inicial a un estado triplete. La corta duración de este estado triplete permite la interacción del fotosensibilizador excitado con las moléculas circundantes, y es durante este estado cuando se generan las especies citotóxicas producidas durante la TFD (Dougherty y cols., 1998). El producto citotóxico, generalmente oxígeno singlete (O_2), no puede migrar más de 0,02 μm después de su formación, haciéndolo ideal para la aplicación local de la TFD, sin riesgo de daño a moléculas o células u órganos distantes (Dougherty y cols., 1998).

Para que la TFD sea exitosa, es necesario seleccionar un fotosensibilizador no tóxico, efectivo, y que la longitud de onda empleada para su fotoexcitación se encuentre comprendida dentro del espectro de absorción óptica del fotosensibilizador (Pfitzner y cols., 2004). Aunque la penetración en las bacterias Gram negativas es difícil, debido a la complejidad de la membrana externa que contiene lipoproteínas y lipopolisacáridos, el fotosensibilizador debe penetrar la membrana celular bacteriana (Pinheiro y cols., 2010). Los fotosensibilizadores antimicrobianos como porfirinas, talocianinas, y fenotiazinas (azul

de toluidina, azul de metileno) pueden directamente dirigirse contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Gois y cols., 2010; Wilson, 2004).

En este estudio se ha empleado como fotosensibilizador azul de metileno, que ha sido activado con un laser de baja potencia para su aplicación en TFD. La seguridad de ambos (azul de metileno y laser de baja energía) ha sido documentada en estudios recientes, mostrando su inocuidad sobre los tejidos dentales humanos ((Menardi y cols., 2006; Pereira, 2004; Calderín y cols., 2012).

Uno de los problemas en la evaluación de la eficacia de la TFD es la falta de consenso a la hora de determinar el calendario o esquema de tratamiento a seguir que permita llegar a mejores resultados. Aunque hay alguna orientación en los experimentos previos, persisten los resultados contradictorios en términos de los resultados clínicos obtenidos. Más aun, hay grandes diferencias en la literatura publicada, respecto a métodos experimentales, poblaciones estudiadas, sustancias fotosensibilizadoras y condiciones de la irradiación.

En la mayor parte de estudios descritos en la literatura se ha evaluado los resultados de la TFD en una única aplicación, posterior al tratamiento de RAR (Braun y cols., 2008; Polansky y cols., 2009; Chondros y cols., 2009; Ramos de Oliveira y cols., 2009), mientras son escasos los estudios que han evaluado los resultados de la aplicación repetida de TFD (Lulic y cols., 2009; Ge y cols., 2011).

Nuestro estudio evalúa los resultados clínicos, antiinflamatorios y antioxidantes del efecto complementario de la TFD en el tratamiento no quirúrgico en pacientes con enfermedad periodontal crónica, aplicada en una única dosis o en dosis repetidas (5 sesiones durante las dos primeras semanas de tratamiento). Las comparaciones *intragrupo* entre el estado basal inicial antes del tratamiento y el estado al 1^{er} y 2^o mes post-terapia,

mostraron mejorías estadísticamente significativas en todos los parámetros clínicos investigados (PPBT, PSBT y PS) para todas las modalidades de estudio. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas *intergrupos* en los parámetros clínicos evaluados, excepto una significativa reducción del sangrado en las bolsas con profundidad $\geq 7\text{mm}$ en los tratamientos complementados por TFD. Aunque los resultados también han demostrado que la mayoría de los cambios clínicos se producen durante las primeras 4 semanas post-tratamiento, destaca el hecho de que la única diferencia significativa que aparece a las 4 semanas post-tratamiento respecto al PSBT tiene lugar en el grupo RAR+TFDr, adelantándose respecto al cambio del mismo parámetro en los otros dos grupos observados. Estos resultados deben ser analizados cuidadosamente teniendo en cuenta que se trata de un estudio a corto plazo, en el que la curación clínica todavía no se ha completado, por el corto tiempo transcurrido después del tratamiento.

Teniendo en cuenta los datos disponibles en otros estudios clínicos publicados, parece ser que en pacientes con PC, el uso de la TFD complementaria al RAR, puede resultar a corto plazo (hasta 3 o 6 meses), en mayores reducciones en cuanto al sangrado al sondaje en comparación con RAR, y en una reducción de PS y aumento de los niveles de inserción clínica, comparables a los obtenidos tras un RAR aplicado únicamente (Christodoulides y cols., 2008; Chondros y cols., 2009; Polansky y cols., 2009). La mayor mejoría en cuanto a la reducción del sangrado puede atribuirse en parte, al efecto adicional de foto-biomodulación mediado por la radiación láser de baja potencia, aplicada durante la terapia fotodinámica (Qadri y cols., 2005). Estos mismos procedimientos de tratamiento RAR ó RAR complementado con TFD, revelan cambios microbiológicos similares en los patógenos periodontales comunes (Christodoulides y cols., 2008; Chondros y cols., 2009; Polansky y cols., 2009 y Meisel y Kocher, 2005). Recientemente, Theodoro y

colaboradores, en un estudio de 6 meses de duración, concluyen que la TFD como complemento del RAR produce una reducción significativa y en mayor extensión que el RAR aplicado en exclusividad, respecto a algunos de los periodontopatógenos clave (*Aa*, *Pi*, y *Tf*), aunque no llega a producir efectos estadísticamente significativos en términos de respuesta clínica (evolución de índice de placa visible, índice gingival, profundidad de sondaje, recesión gingival y nivel de inserción clínica) (Theodoro y cols., 2012).

Un estudio reciente de 10 pacientes con terapia periodontal de mantenimiento, en 70 bolsas residuales ($PS \geq 5$ mm) y un diseño de grupos paralelos, ha confirmado los efectos positivos del empleo de sesiones de TFD repetidas (5 sesiones de TFD a lo largo de dos semanas, al igual que en el presente estudio), complementando al RAR en las bolsas periodontales tratadas, tales como una mayor reducción de PS, aumento de los niveles de inserción clínica y disminución del sangrado al sondaje a los 6 meses post-tratamiento (Lulic y cols., 2009). Ante estos resultados con un protocolo de actuación muy similar al seguido en el presente estudio, cabe plantear cuales serían nuestros resultados a más largo plazo (6 y 12 meses).

El sangrado al sondaje es considerado como un indicador objetivo de inflamación gingival y está asociado con una posibilidad aumentada de pérdida de inserción posterior (Chaves y cols., 1993). Respecto a la evaluación del sangrado al sondaje, es importante que durante el sondeo periodontal sea aplicada una fuerza estandarizada para evitar resultados falsos positivos (Lang y cols., 1991). Por este motivo, nuestras evaluaciones fueron realizadas por un operador bien entrenado y con amplia experiencia, quien aplicó una suave presión con instrumentos estandarizados durante las correspondientes evaluaciones. En el presente estudio, se ha observado una mejoría significativa respecto a la disminución del porcentaje de sangrado en bolsas ≥ 7 mm., tanto cuando el tratamiento convencional se

complementa con una única o con varias dosis de TFD, además de una disminución del sangrado más temprana en el grupo complementado con varias dosis de TFD, lo que podría sugerir una reducción del grado de inflamación periodontal como consecuencia de los tratamientos aplicados.

Cuando se estudia el estado de destrucción periodontal, los patrones de citocinas son de un valor importante ya que es sabido que los productos bacterianos estimulan los monocitos/macrófagos, linfocitos y otros tipos de células (fibroblastos y células endoteliales) para secretar citocinas regulatorias inmunes y pro-inflamatorias.

La TFD debido a su potencial para reducir algunos factores de virulencia claves, tales como lipopolisacáridos y proteasas (Kömerik y cols., 2000) en las fases tempranas de la cascada inmune, podría producir consecuentemente una disminución de mediadores inflamatorios que promueven los procesos de pérdida de tejidos característicos de la enfermedad periodontal. El esclarecimiento de esta hipótesis ha sido por tanto uno de los objetivos del presente estudio.

La penetración de bacterias y/o sus productos en los tejidos resulta en el reclutamiento y activación del eje monocito/linfocito T. Este a su vez lleva a la liberación reforzada de FNT- α y otras citocinas asociadas con la destrucción periodontal (Ramos de Oliveira y cols. 2009). Además de la presentación de efectos directos en la patogénesis de la enfermedad periodontal, el FNT- α regula la producción de otras clásicas citocinas pro-inflamatorias de la inmunidad innata, tales como la IL-1 β y la IL-6 (Okada y Murakami., 1998; Dinarello, 2000; Wajan y cols., 2003), y también actúa en el proceso de migración celular a múltiples niveles, induciendo la regulación de moléculas de adhesión y la producción de quimiocinas, las cuales son citocinas quimioatrayentes involucradas en la migración celular hacia los sitios infectados e inflamados (Peschon y cols., 1998; Dinarello,

2000). El FNT- α está presente en altos niveles en la periodontitis tanto en el FCG como en tejidos periodontales enfermos, donde está positivamente relacionado con la expresión de MMPs y RANKL (Graves y Cochran, 2003; Graves y cols., 2008). Adicionalmente, la IL-1 β y la IL-6 han sido asociadas con los procesos de migración celular inflamatoria y de osteoclastogénesis (Graves y cols., 2008). De este modo, mientras su ausencia individual atenúa la pérdida inflamatoria de hueso, la inhibición simultánea de estas citocinas da como resultado una protección más efectiva, que lleva a la remisión casi completa de la actividad osteoclastogénica (Graves y Cochran, 2003, Sartori y cols., 2009).

La mayoría de los estudios publicados en cuanto al efecto del tratamiento periodontal sobre los mediadores inflamatorios, muestran la disminución de la concentración de citocinas en surco gingival después del RAR, especialmente en cuanto a la reducción de la concentración de IL-1 β se refiere (Tsai y cols., 2005b; Giannopoulou y cols., 2003). Los resultados obtenidos en el presente estudio tras la aplicación exclusiva de RAR y RAR complementado por una única sesión de TFD, concordarían más con los resultados publicados en un estudio realizado por Yoshinari y cols., en el cual se investigó la relación entre los cambios clínicos y el nivel de IL-1 β después de la terapia periodontal convencional en pacientes con PC, observándose clara mejoría de los índices clínicos y ligero aumento de la concentración de IL-1 β (Yoshinari y cols., 2004). Sin embargo, sí se observa una clara y opuesta tendencia en el grupo RAR+ TFD_r, donde los niveles de IL-1 β y TNF- α sufren un descenso a las 4 semanas para volver a incrementarse en las 4 semanas posteriores.

Estudios previos han mostrado que la terapia con láser de baja potencia parece lograr una disminución en la producción de citocinas y principalmente tras una fototerapia

aplicada en dosis repetidas (Shimizu y cols., 1995; Qadri y cols., 2005, Calderín y cols., 2012). En el caso particular del presente estudio, el uso conjunto de TFD repetida con RAR, parece servir de freno al aumento de los niveles de IL-1 β y principalmente FNT- α en el FCG, lo cual podría estar condicionado por el uso adicional del láser terapéutico aplicado para fotoexcitar el azul de metileno irrigado gingivalmente. Cabe señalar que no existen apenas trabajos publicados en la literatura sobre el efecto del tratamiento con TFD sobre los niveles de citocinas pro-inflamatorias. Únicamente, el grupo de De Oliveira en un estudio de los niveles de citocinas en el FCG de pacientes con periodontitis agresiva después de ser tratados con TFD ó RAR, mostraron que ambas modalidades de tratamiento redujeron significativamente los niveles de TNF- α y del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) en FCG (de Oliveira y cols., 2009). En nuestro caso, solo el empleo de TFD en dosis repetidas causaría una diferencia en la tendencia inflamatoria, conteniéndola, sin que por ello los resultados fueran estadísticamente significativos respecto al estado inicial.

En cuanto al análisis del estado antioxidante total del FCG, apenas se observan diferencias estadísticamente significativas intra e intergrupos. Aunque pudiera ser esperable una disminución en los grupos RAR+TFD y principalmente en el grupo RAR+TFDr, debido a una incrementada eficiencia en la producción de oxígeno singlete tras la fotoactivación del azul de metileno para provocar muerte bacteriana, este incremento a su vez puede que se vea compensado por una disminución del estrés oxidativo, efecto que ha sido documentado tras la aplicación del láser terapéutico (Silveira y cols., 2011; Servetto y cols., 2010) y por una disminución de la carga antigénica relacionada con una disminución del nicho bacteriano. Por ello también, aunque con el tratamiento RAR+TFDr el proceso

inflamatorio se frena, ello sin embargo no lleva asociado un incremento del estado antioxidante total del FCG, al menos en tan corto plazo (8 semanas).

Al interpretar los datos disponibles en la literatura, es evidente que estudios clínicos aleatorios controlados, evaluando los beneficios clínicos, microbiológicos y potencial inmunológico de la TFD en el tratamiento de la periodontitis, son todavía limitados. Las principales dificultades que estos estudios entrañan pueden estar relacionadas con un número bastante limitado de pacientes, la corta duración de los estudios (es decir, 3 ó 6 meses) y el hecho de que todavía no ha sido establecido el protocolo más efectivo de TFD.

Los resultados de este estudio mostraron que el tratamiento complementario con TFD en una sola dosis o en dosis repetidas produjo a nivel clínico una ligera una mejora adicional frente al RAR aplicado en exclusividad, traducida en un descenso del porcentaje de sangrado en las bolsas de mayor profundidad y en una disminución más temprana en el PSBT aportado por la aplicación repetida de TFD. Además, el tratamiento complementado con dosis repetidas de TFD se mostró efectivo para contener la inflamación periodontal como puede verse por el no incremento de los niveles de IL-1 β y FNT- α en el FCG. Los datos disponibles parecen indicar que el uso coadyuvante de la terapia fotodinámica puede mejorar algunos resultados, pero se necesitan más estudios *in vivo* a largo plazo para investigar los efectos clínicos, inmunológicos y antimicrobianos, después de repetidas dosis de TFD complementaria, con el fin de clarificar los posibles beneficios.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Investigación permiten concluir que:

1. La terapia periodontal de RAR, así como de RAR complementado con TFD en una o en 5 aplicaciones, produce resultados **clínicos** positivos significativos en pacientes con periodontitis crónica, que se evidencian en los parámetros de PS, PSBT y PPBT.
2. La terapia periodontal de RAR complementado con una aplicación o con 5 aplicaciones de TFD, disminuye el porcentaje de sangrado en las bolsas ≥ 7 mm de profundidad, frente al RAR aplicado en exclusividad. Además, se observa una disminución más temprana en el PSBT aportado por la aplicación repetida de TFD.
3. La aplicación de TFD en cinco sesiones como complemento al RAR en el tratamiento de la periodontitis crónica, conduce a mejores resultados **inmunológicos** que el RAR o incluso que RAR complementado con una aplicación de TFD y estos resultados se evidencian en el mantenimiento de los niveles en FCG de IL-1 β y FNT- α .
4. El estado antioxidante total del FCG no presentó variaciones tras la aplicación del tratamiento con RAR, RAR complementado con una sesión de TFD ni RAR complementado con 5 sesiones de TFD.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adriaens P.A., Adriaens L.M. (2004). Effects of non-surgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontology* 2000, 36: 121-145.

Armitage G.C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annual Periodontology*, 4: 1-7.

Bascones A., Noronha S., Gómez M., Mota P., González Moles M.A., Dorrego M.V. (2005). Tissue destruction in periodontitis: bacteria or cytokines fault? *Quintessence International*, 36: 299–306.

Bernimoulin J.P. (2003). Recent concepts in plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology*, 30 Suppl 5:7-9.

Bjordan J.M., Johnson M.I., Iversen V., Aimbire F., Lopes-Martins R.A. (2006). Photoradiation in acute pain: a systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomedicine and Laser Surgery*, 24(2):158–168. (si)

Braun A., Dehn C., Krause F., Jepsen S. (2008). Short clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment a randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 35:877–884.

Brayer W.K., Mellonig J.T., Dunlap R.M., Marinak K.W., Carson R.E. (1989). Scaling and root planning effectiveness: the effect of root surface access and operator experience. *Journal of Periodontology*. 60(1): 67-72.

Brenner D.A., O'Hara M., Angel P., Chojkier M., Karin M. (1989). Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*, 337: 661–663.

Brock G.R., Matthews J., Butterworth C., Chapple I.L.C. (2002). Plasma and crevicular fluid antioxidant defense in periodontitis and health. *Journal of Dental Research*, 81 (Spec Iss A): Abstract 1524.

Brock G.R., Butterworth C.J., Matthews J.B., Chapple I.L.C. (2004). Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(7): 515-21.

Buchanan S.A., Robertson P.B. (1987). Calculus removal by scaling and root planning with and without surgical access. *Journal of Periodontology*, 58:159–163.

Calderín S., García-Núñez J.A., Gómez C. (2012). Short-term clinical and osteoimmunological effects of scaling and root planing complemented by simple or repeated Laser Phototherapy in chronic periodontitis. *Lasers in Medical Sciences*. DOI: 10.1007/s10103-012-1104-5.

Champagne C.M.E., Buchanan W., Reddy M.S., Preisser J.S., Beck J.D., Offenbacher S. (2003). Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 31:167-180.

Chapple I.L.C., Landini G., Griffiths G.S., Patel N.C., Ward R.S.N. (1999). Calibration of the Periotron 8000[®] and 6000[®] by polynomial regression. *Journal of Periodontal Research*, 34: 79-86.

Chapple I.L.C., Brock G.R., Milward M.R., Ling N., Matthews J.B. (2007). Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *Journal of Clinical Periodontology*, 34: 103–110.

Chaves E.S., Wood R.C., Jones A.A., Newbold D.A., Manwell M.A., Kornman K.S. (1993). Relationship of “bleeding on probing” and “gingival index bleeding” as clinical parameters of gingival inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 20: 139-143.

Chondros P., Nikolidakis D., Christodoulides N., Rössler R., Gutknecht N., Sculean A. (2009). Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science*, 24:681–688.

Christodoulides N., Nikolidakis D., Chondros P., Becker J., Schwarz F., Rössler R., Sculean A. (2008). Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *Journal of Periodontology*, 79(9): 1638-44.

Cobb C.M. (1996). Non-surgical pocket therapy: mechanical. *Annual Periodontology*, 1: 443–490.

Dayer, J.M., Beutler B., Cerami A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *Journal of Experimental Medicine*, 162: 2163–2168.

Delima A.J., Oates T., Assuma R., Schwartz Z., Cochran D., Amar S., Graves D.T. (2001). Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 233–240.

De Oliveira R., Schwartz-Filho H.O., Novaes Jr. A.B., Garlet G.P., de Souza R.F., Taba Jr. M., Scombatti de Souza S.L., Ribeiro F.J. (2009). Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. *Journal of Periodontology*, 80: 98-105.

Dinarello C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87: 2095–2147.

Dinarello C.A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118:503-508.

Dinareello, C.A. (2007). Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology*, 37, S34–S45.

Dörtbudak O., Haas R., Bernhart T., Mailath-Pokorny G. (2001). Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 12, 104–108.

Dougherty T.J. y Marcus S.L. (1992). Photodynamic therapy. *European Journal of Cancer*, 28A: 1734–1742.

Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal National Cancer Institute*, 90(12):889-905.

El-Yazami H., Zeinoun T., Bou Saba S., Lamard L., Peremans A., Limme M., Geerts S., Lamy M., Nammour S. (2010). Pulp temperature increase during photo-activated disinfection (PAD) of periodontal pockets: an in vitro study. *Lasers in Medical Science*, 25(5): 655-9.

Engelbreton S.P., Lalla E., Lamster I.B. (1999). Periodontitis and systemic disease. *New York State Dentistry Journal*, 65(8):30-2.

Feres M., Haffajee A.D., Allard K., Som S., Socransky S.S. (2001). Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 597-609.

Fujihashi K., Kono Y., Beagley K.W., Yamamoto M., Mc Ghee J.R., Mestecky J., Kiyono H. (1993). Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. *Journal of Periodontology*, 64: 400–406.

Garlet G.P., Martins W. Jr, Fonseca B.A., Ferreira B.R., Silva J.S. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(8): 671-9.

Ge L., Shu R., Li Y., Li Ch., Luo L., Song Z., Xie Y., Liu D. (2011). Adjunctive effect of Photodynamic Therapy to Scaling and Root planning in the treatment of Chronic periodontitis. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29: 33-37.

Gemmell E., Grieco D.A., Seymour G.J. (2000). Chemokine expression in *Porphyromonas gingivalis*-specific T-cell lines. *Oral Microbiology and Immunology*, 15:166-171.

Giannopoulou C., Cappuyns I., Mombelli A. (2003). Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 30: 996-1002.

Gois M.M., Kurachi C., Santana E.J., Mima E.G., Spolidorio D.M., Pelino J.E., Bagnato V.S. (2010). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. *Lasers in Medical Sciences*, 25(3): 391–395.

Graves D.T., Cochran D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology* 74, 391–401.

Graves D.T., Fine D., Teng Y.T., Van Dyke T.E., Hajishengallis G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35:89-105.

Greenstein G. (2000). Nonsurgical periodontal therapy in 2000: a literature review. *Journal of American Dental Association*, 131: 1580–1592.

Haas R., Dörtbudak O., Mensdorff-Pouilly N., Mailath G. (1997). Elimination of bacteria on different implant surfaces through photosensitization and soft laser. An in vitro study. *Clinical Oral Implants Research*, 8: 249–254.

Haffajee A.D., Uzel N.G., Arguello E.I., Torresyap G., Guerrero D.M., Socransky S.S. (2004). Clinical and microbiological changes associated with the use of combined antimicrobial therapies to treat “refractory” periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 31: 869- 877.

Heasman P.A., Collins J.G, Offenbacher S. (1993). Changes in crevicular fluid levels of interleukin-1- β , leukotriene B4, prostaglandin E2, thromboxane B2 and tumour necrosis factor alpha in experimental gingivitis in humans. *Journal of Periodontal Research*, 28: 241–247.

Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppellotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G. (2006). Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38: 468–481.

Kamerik N., Wilson M., Poole S. (2000). The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 72: 676-680.

Kawai T., Shimauchi H., Eastcott J.W., Smith D.J., Taubman M.A. (1998). Antigen direction of specific T-cell clones into gingival tissues. *Immunology*, 93: 11–19.

Kobayashi K., Takahashi N., Jimi E., Udagawa N., Takami M., Kotake S., Nakagawa N., Kinoshita M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Morinaga T., Higashio K., Martin T. J. & Suda T. (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK interaction. *Journal of Experimental Medicine*, 191: 275–286.

Kömerik N., Wilson M., Poole S. (2000). The effect of photodynamic action on two virulence factors of Gram-negative bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 72: 676-680.

Kömerik N., Nakanishi H., MacRobert A.J., Henderson B., Speight P., Wilson M. (2003). In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 932-940.

Konopka K., Goslinski T. (2007). Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research*, 86(8): 694–707.

Kovacic J.C., Gupta R., Lee A.C., Ma M., Fang F., Tolbert C.N., Walts A.D., Beltran L.E., San H., Chen G., St Hilaire C., Boehm M. (2010). Stat3-dependent acute Rantes production in vascular smooth muscle cells modulates inflammation following arterial injury in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120: 303–314.

Kurtis B., Tüter G., Serdar M., Akdemir P., Uygur C., Firatli E., Bal B. (2005). Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- α in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76: 1849–1855.

Lang NP., Nyman S., Senn C., Joss A. (1991). Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(4): 257-61.

Lerner U.H. (2006). Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research*, 85: 596-607.

Lo Y.J., Liu C.M., Wong M.Y., Hou L.T., Chang W. K. (1999). Interleukin 1 β secreting cells in inflamed gingival tissue of adult periodontitis patients. *Cytokine*, 11: 626–633.

Lulic M., Leiggener Görög I., Salvi G.E., Ramseier C.A., Mattheos N., Lang N.P. (2009). One-year outcomes of repeated adjunctive photodynamic therapy during periodontal maintenance: a proof-of-principle randomized-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 36: 661–666.

Martinetto P., Gariglio M., Lombard G.F., Fiscella B., Boggio F. (1986). Bactericidal effects induced by laser irradiation and haematoporphyrin against Gram-positive and Gram-negative microorganisms. *Drugs Exp Clin Res* 1986; 12:335-342.

Meisel P., Kocher T. (2005). Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 79: 159-170.

Menardi A.C., Viaro F., Vicente W.V., Rodrigues A.J., Evora P.R. (2006). Hemodynamic and vascular endothelium function studies in healthy pigs after intravenous bolus infusion of methylene blue. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*; 87: 525-532.

- Moan J, Berg K (1991). The photodegradation of porphyrins in cells that can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, 53 (4): 549–553.
- Modlin, R.L., Nutman, T.B. (1993). Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Current Opinion in Immunology* 5, 511–517.
- Murphy, K.M., Ouyang, W., Farrar, J. D., Yang, J., Ranganath, H., Asnagli, H., Afkarian, M., Murphy, T.L. (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annual Review of Immunology*, 18: 451–494.
- Okada, H., Murakami, S. (1998). Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews of Oral Biology and Medicine* 9: 248–266.
- O’Leary TJ, Drake RB, Naylor JE (1972). The plaque control record. *Journal of Periodontology*, 43:38.
- O’Leary T.J. (1986). The impact of research on scaling and root planing. *Journal of Periodontology*. 57: 69-75.
- Page R.C., Offenbacher S., Schroeder H.E., Seymour G.J., Kornman K.S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology* 2000, 14:216–248.
- Pendyala G., Thomas B., Kumari S. (2008). The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 12(3):79-83.
- Peng Q., Moan J., Nesland J.M. (1996). Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastructural Pathology*, 20: 109–129.
- Pereira A. (2004). Methylene-blue-photoinactivated plasma and its contribution to blood safety. *Transfusion*, 44: 948-950.
- Peschon J.J., Torrance D.S., Stocking K.L., Glaccum M.B., Otten C., Willis C.R., Charrier K., Morrissey P.J., Ware C.B., Mohler K.M. (1998). TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *Journal of Immunology*, 160: 943-952.
- Pfitzner A., Sigusch B.W., Albrecht V., Glockmann E. (2004). Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *Journal of Periodontology*, 75: 1343–1349.
- Pinheiro S.L., Donegá J.M., Seabra L.M.S., Adabo M.D., Lopes T., do Carmo T.H.D., Bertolini P.F.R. (2010). Capacity of photodynamic therapy for microbial reduction in periodontal pockets *Lasers in Medical Sciences*, 25: 87–91.

Polansky R., Haas M., Heschl A., Wimmer G. (2009). Clinical effectiveness of photodynamic therapy in the treatment of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 36: 575–580.

Preshaw P.M., Taylor J.J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of Clinical Periodontology*, 38 (Suppl. 11): 60–84.

Qadri T., Miranda L., Tunér J., Gustaffson A. (2005). The short-term effects of low level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 32: 714-719.

Qin Y.L., Luan X.L., Bi L.J., Sheng Q., Zhou C.N., Zhang Z.G. (2008). Comparison of toluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *Journal of Periodontology Research*, 43: 162–167.

Ramos de Oliveira R., Schwartz-Filho H.O., Novaes Jr. A.B., Pompermaier Garlet G., Freitas de Souza R., Taba Jr. M., Scombati de Souza S.L. & Jeter F. (2009) . Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: Cytokine Profile in Gingival Crevicular Fluid, Preliminary Results. *Journal of Periodontology*, 80: 98-105.

Ridderstad A., Abedi-Valugerdi M., Moller E. (1991). Cytokines in rheumatoid arthritis. *Annals of Medicine* 23, 219–223.

Sartori R., Li F., Kirkwood K.L. (2009). MAP kinase phosphatase-1 protects against inflammatory bone loss. *Journal Dental Research*, 88(12): 1125-30.

Sbordone L., Ramaglia L., Gulletta E., & Iacono V. (1990). Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *Journal of Periodontology*, 61(9): 579-84.

Scholz D., Devaux B., Hirche A., Potzsch B., Kropp B., Schaper W., Schaper J. (1996). Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Research*, 284: 415–423.

Servetto N., Cremonezzi D., Simes J.C., Moya M., Soriano F., Palma J.A., Campana V.R. (2010). Evaluation of inflammatory biomarkers associated with oxidative stress and histological assessment of low-level laser therapy in experimental myopathy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 42(6): 577-83.

Shimizu N., Yamaguchi M., Goseki T., Shibata Y., Takiguchi H., Iwasawa T., Abiko Y. (1995). Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin 1- β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research*, 74: 1382-1388.

Sigusch B.W., Engelbrecht M., Völpele A., Holletschke A., Pfister W., Schütze J. (2010). Full-mouth antimicrobial photodynamic therapy in *Fusobacterium nucleatum*- infected periodontitis patients. *Journal of Periodontology*, 81: 975-981.

Silness J., Loe H. (1964). Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica*, 22: 121-135.

Silva N., Dutzan N., Hernandez M., Dezerega A., Rivera O., Aguilon J. C., Aravena O., Lastres P., Pozo P., Vernal R., Gamonal J. (2008). Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *Journal of Clinical Periodontology*, 35: 206–214.

Silveira P.C., Silva L.A., Freitas T.P., Latini A., Pinho R.A. (2011). Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of wound healing. *Lasers in Medical Sciences*, 26(1): 125-31.

Soga Y., Nishimura F., Ohyama H., Maeda H., Takashiba S., Murayama Y. (2003). Tumor necrosis factor- α gene (TNF- α) –1031/ –863, –857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *Journal of Clinical Periodontology*, 30: 524–531.

Stashenko P., Dewhirst F.E., Peros W.J., Kent R.L. (1987). Synergistic interaction between IL-1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *Journal of Immunology*, 138: 1464–1468.

Stashenko P., Jandinski J. J., Fujiyoshi P., Rynar J., Socranski S. S. (1991). Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 62: 504–509.

Stathopoulou P.G., Benakanakere M.R., Galicia J.C., Kinane D.F. (2009). The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiology and Immunology*, 24:11–17.

Takahashi K., Poole I., Kinane D. F. (1995). Detection of interleukin-1 beta RNA expressing cells in human gingival crevicular fluid by in situ hybridization. *Archives of Oral Biology*, 40: 941–947.

Takasaki A.A., Aoki A., Mizutani K., Schwarz F., Sculean A., Wang C. Y., Abiko Y., Ishikawa I., Izumi Y. (2009). Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant Diseases. *Periodontology 2000*, 51: 109–140.

Teng Y.T. (2003). The role of oxygen radicals in human disease with particular acquired immunity and periodontal disease progression. *Critical Reviews of Oral Diseases*, 6:138–151.

Tervahartiala T., Koski, H., Xu J.W., Häyrynen-Immonen R., Hietanen J., Sorsa T., Konttinen Y.T. (2001). Tumor necrosis factor-alpha and its receptors, p55 and p75, in gingiva of adult periodontitis. *Journal Dental Research* 80: 1535–1539.

Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. (2008). Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews* 223: 87–113.

Theodoro L.H., Silva S.P., Pires J.R., Soares G.H.G., Pontes A.E.F., Zuza E.P., Spolidório D.M.P., de Toledo B.E.C. y Garcia V.,G. (2012). Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers in Medical Sciences*, DOI 10.1007/s10103-011-0942-x.

Thomson B.M., Mundy G.R., Chambers T.J. (1987). Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *Journal of Immunology* 138: 775–779.

Tsai C.C., Chen H.S., Chen S.L., Ho Y.P., Ho K.Y., Wu Y.M., Hung C.C. (2005a). Lipid peroxidation: a possible role in the induction and progression of chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 40: 378–384.

Tsai I.S., Tsai C.C., Ho Y.P., Ho K.Y., Wu Y.M., Hung C.C. (2005b) Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine*, 31: 34-40.

Vandenbroeck K., Goris A. (2003). Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: Gateways to novel targets for immunotherapy? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24: 284-289.

Von Tappeiner H., Jodlbauer A. (1904). Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Dtsch Arch Klin Med* 39: 427–487.

Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*, 10: 45-65.

Walker A., Ash M.N. (1976). A study of root planning by scanning electron microscopy. *Dental Hygiene (Chic)*, 50:109–114.

Walsh L.J. (2003). The current status of laser applications in dentistry. *Australian Dental Journal*, 48:146–155.

Wilson M., Dobson J., Harvey W. (1992). Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Current Microbiology*, 25: 77 -81.

Wilson M. (2004). Lethal photosensitization of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemistry and Photobiology Sciences*, 3: 412–418.

Woodruff L.D., Bounkeo J.M., Brannnon W.M., Dawes K.D., Barham C.D., Waddell D.L., Enwemeka C.S. (2004). The efficacy of laser therapy in wound repair: a meta-analysis of the literature. *Photomedicine and Laser Surgery*, 22: 241–247.

Yamamura M., Uyemura K., Deans R. J., Weinberg K., Rea T. H., Bloom B. R., Modlin R. L. (1991). Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 254: 277–279.

Yilmaz S., Kuru B., Kuru L., Noyan Ü., Argun D., y Kadir T. (2002). Effect of Gallium - Arsenide Diode laser on human periodontal disease: a microbiological and clinical study. *Lasers in Surgery and Medicine*, 30: 60- 66.

Yoshinari N., Kawase H., Mitani A., Ito M., Sugiishi S., Matsuoka M., Shirozu N., Ishihara Y., Bito B., Hiraga M., Arakawa K., Noguchi T. (2004). Effects of scaling and root planing on the amounts of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist and the mRNA expression of interleukin-1beta in gingival crevicular fluid and gingival tissues. *Journal of Periodontal Research*, 39: 158-167.